

# 高致病性 H7N9 亚型流感病毒 RT-PCR

## 检测试剂盒说明

**用途** 高致病性 H7N9 亚型流感病毒反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测试剂盒, 动物组织、泄殖腔拭子 (禽类) 或鼻拭子 (猪)、环境样品高致病性 H7N9 流感病毒 (HP-H7N9) 的 RNA, 适用于 HP-H7N9 的检测、诊断和流行病学调查。

**原理** 利用离心柱内硅基质膜提取 RNA, 在反转录酶的作用下, 以 RNA 为模板, 以引物为起点合成与 RNA 模板互补的 cDNA 链。在 TaqDNA 聚合酶的作用下, 经高温变性、低温退火、中温延伸的循环, 使特异 DNA 片段的拷贝数放大一倍。经过 35 次循环, 最终使扩增 DNA 片段放大了数百万倍。将扩增 DNA 片段进行电泳, 经染色后, 在紫外灯照射下, 肉眼可见到 DNA 片段的扩增带。

## 试剂盒组成

| 名称                         | 10 头份       | 50 头份       | 贮藏条件                   |
|----------------------------|-------------|-------------|------------------------|
| 0.2 mL 薄壁 PCR 管            | 15 个        | 60 个        | 室温 (A 盒)               |
| 吸附柱和收集管                    | 10 套        | 50 套        |                        |
| 裂解液                        | 6 mL        | 30 mL       |                        |
| 洗液                         | 12 mL       | 60 mL       |                        |
| 洗脱液                        | 1 mL        | 10 mL       |                        |
| 矿物油                        | 300 $\mu$ L | 1.2 mL      |                        |
| 50 倍 TAE 电泳缓冲液 (50 倍稀释后使用) | 20 mL       | 100 mL      |                        |
| 染色液                        | 20 $\mu$ L  | 50 $\mu$ L  |                        |
| 上样缓冲液                      | 50 $\mu$ L  | 250 $\mu$ L | -20 $^{\circ}$ C (B 盒) |
| 阴性对照                       | 350 $\mu$ L | 1 mL        |                        |
| 阳性对照                       | 350 $\mu$ L | 1 mL        |                        |
| RT-PCR 反应液                 | 200 $\mu$ L | 1 mL        |                        |
| X 液                        | 5 $\mu$ L   | 10 $\mu$ L  |                        |
| 酶混合液                       | 15 $\mu$ L  | 65 $\mu$ L  |                        |

**保存期** 本产品有效期为 6 个月。

## 需自备的物品

1. 仪器: 分析天平、离心机、PCR 扩增仪、电泳仪、电泳槽、紫外凝胶成像仪 (或紫外分析仪)、微波炉、组织研磨器、-20  $^{\circ}$ C 冰箱、可调移液器 (2  $\mu$ L、20  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1000  $\mu$ L)。
2. 耗材: 眼科剪、眼科镊、称量纸、20 mL 一次性注射器、生理盐水、琼脂糖、500 mL 量筒、500 mL 锥形瓶、经焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水处理的灭菌 1.5 mL 离心管和吸头 (10  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1000  $\mu$ L)、灭菌双蒸水。

## 注意事项

1. 所有接触病料的物品均应合理处置, 以免污染实验室。
2. PCR 整个试验分配液区、模板提取区、扩增区、电泳区。流程顺序为配液区→模板提取区→扩增区→电泳区。严禁器材和试剂倒流。
3. 所有试剂应在规定的温度储存。-20 $^{\circ}$ C 保存的各试剂管使用前应完全融化, 8000 rpm 离心 15 s, 使液体全部沉于管底, 放于冰盒中, 吸取液体时移液器吸头尽量在液体表面层吸取, 使用后立

即放回-20℃。

- 在 RNA 提取过程中，避免 RNA 酶污染，尽量缩短操作时间。
- 染色液低毒，操作时应戴上手套，避光保存，较长时间不使用请存放于 4℃，以免挥发变干。**  
染色液和上样缓冲液使用前也请离心使液体沉于管底。
- 注意防止试剂盒组分受污染。不要使用超过有效期限的试剂，试剂盒之间的成分不要混用。
- 严格遵守操作说明可以获得最好的结果。操作过程中移液、定时等全部过程必须精确。
- 反复冻融试剂将降低检测灵敏度，建议在 3 次内用完，请严格按试剂盒说明书操作。

## 样品制备

**1 样品采集：**病死或扑杀动物，取喉气管、脑、胸肌、心肌和肺等组织；待检活动物，用棉拭子取咽喉拭子、泄殖腔拭子、鼻拭子等，置于 50%甘油生理盐水中（拭子留在管中）。2~8℃保存，送实验室检测。（要求送检病料新鲜，严禁反复冻融。）

**2 样品处理：**每份样品分别处理。

2.1 组织样品处理：每份组织分别从三个不同的位置称取样品约 1g，用手术剪剪碎混匀后取 0.02 g 于研磨器中研磨，加入 1.5 mL 生理盐水继续研磨，待匀浆后转至 1.5 mL 灭菌离心管中，8000 rpm 离心 2 min，取上清液 100 μL 于 1.5 mL 灭菌离心管中。

2.2 拭子样品处理：样品在振荡器上充分混匀，取上清液 100 μL，置 1.5 mL 灭菌离心管中。

2.3 阳性对照处理：取阳性对照 100 μL，置 1.5 mL 灭菌离心管中。

2.4 阴性对照处理：取阴性对照 100 μL，置 1.5 mL 灭菌离心管中。

## 操作步骤

### 1 病毒 RNA 的提取

1.1 取已处理的样品、阴性对照和阳性对照，分别加入裂解液 600 μL，充分颠倒混匀，室温静置 3~5 min。

1.2 将液体吸入吸附柱中（吸附柱要套上收集管，吸取液体时尽量不要吸到悬浮杂质，以免离心时堵塞吸附柱），13000 rpm 离心 30 s。

1.3 弃去收集管中液体，加入 600 μL 洗液，13000 rpm 离心 30 s。

1.4 重复步骤 1.3。

1.5 弃去收集管中液体，13000 rpm 空柱离心 2 min，以除去残留的洗涤液。

1.6 将吸附柱移入新的 1.5 mL 离心管中，向柱中央加入洗脱液 50 μL，室温静置 1 min，13000 rpm 离心 30 s，离心管中液体即为模板 RNA。

### 2 RT-PCR 扩增

每份总体积 20 μL，含 16.8 μL RT-PCR 反应液（用前混匀），1.2 μL 酶混合液，2 μL 模板 RNA。

例如：n 份样品，配制 n+1 份，16.8×(n+1) RT-PCR 反应液，再加入 1.2×(n+1) 酶混合液，混匀后取 18 μL 分装成 n 份，分别加入 2 μL 模板 RNA（阳性对照管加入 1 μL 阳性对照 RNA 和 1 μL X 液），加入矿物油 20 μL 覆盖（有热盖的 PCR 扩增仪不用加矿物油），作好标记。

在 PCR 扩增仪上进行以下程序：42℃ 45 min，95℃ 3 min；循环 95℃ 30 s，50℃ 40 s，72℃ 40 s，共 35 次；再 72℃ 延伸 10 min。

### 3 电泳

称 3 g 琼脂糖放于 500 mL 锥形瓶中，加入 50 倍稀释的 TAE 电泳缓冲液 200 mL（取 4 mL 50 倍 TAE 电泳缓冲液，用双蒸水稀释至 200 mL），于微波炉中溶解，再加入 10 μL 染色液混匀。在电泳槽内放好梳子，倒入琼脂糖凝胶，待凝固后将 PCR 扩增产物 10 μL 混合 2 μL 上样缓冲液，点样于琼脂糖凝胶孔中，以 110~120V 电压于 50 倍稀释的 TAE 电泳缓冲液中电泳，紫外灯下观察结果。

**结果判定** 阳性对照出现 315 bp 扩增带、阴性对照无带出现（引物带除外）时，实验结果成立。

被检样品出现 315 bp 扩增带为 HP-H7N9 阳性，否则为阴性。